

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 21 APR 2005

PCT

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

(Kapitel II des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts NAE877 03PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Formblatt PCT/PEA/416																									
Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/000099	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09.01.2004	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09.01.2003																								
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N1/15																										
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.																										
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bei diesem Bericht handelt es sich um den internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, der von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde nach Artikel 35 erstellt wurde und dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt wird. 2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 11 Blätter einschließlich dieses Deckblatts. 3. Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; diese umfassen <ol style="list-style-type: none"> a. <input checked="" type="checkbox"/> (an den Anmelder und das Internationale Büro gesandt) insgesamt 8 Blätter; dabei handelt es sich um <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Blätter mit der Beschreibung, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit Berichtigungen, denen die Behörde zugestimmt hat (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften). <input type="checkbox"/> Blätter, die frühere Blätter ersetzen, die aber aus den in Feld Nr. 1, Punkt 4 und im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde eine Änderung enthalten, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht. b. <input type="checkbox"/> (nur an das Internationale Büro gesandt) insgesamt (bitte Art und Anzahl der/des elektronischen Datenträger(s) angeben), der/die ein Sequenzprotokoll und/oder die dazugehörigen Tabellen enthält/enthalten, nur in computerlesbarer Form, wie im Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll angegeben (siehe Abschnitt 802 der Verwaltungsvorschriften). 																										
<ol style="list-style-type: none"> 4. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. I</td> <td>Grundlage des Bescheids</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. II</td> <td>Priorität</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. III</td> <td>Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. IV</td> <td>Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. V</td> <td>Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. VI</td> <td>Bestimmte angeführte Unterlagen</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. VII</td> <td>Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Feld Nr. VIII</td> <td>Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</td> </tr> </table> 			<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. I	Grundlage des Bescheids	<input type="checkbox"/>	Feld Nr. II	Priorität	<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. III	Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit	<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. IV	Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung	<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. V	Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung	<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. VI	Bestimmte angeführte Unterlagen	<input type="checkbox"/>	Feld Nr. VII	Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung	<input type="checkbox"/>	Feld Nr. VIII	Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung
<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. I	Grundlage des Bescheids																								
<input type="checkbox"/>	Feld Nr. II	Priorität																								
<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. III	Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit																								
<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. IV	Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung																								
<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. V	Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung																								
<input checked="" type="checkbox"/>	Feld Nr. VI	Bestimmte angeführte Unterlagen																								
<input type="checkbox"/>	Feld Nr. VII	Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung																								
<input type="checkbox"/>	Feld Nr. VIII	Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung																								
Datum der Einreichung des Antrags 15.07.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.04.2005																									
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Vogt, T Tel. +49 89 2399-8477																									



Feld Nr. I Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Sprache** beruht der Bericht auf der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Der Bericht beruht auf einer Übersetzung aus der Originalsprache in die folgende Sprache, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für folgenden Zweck eingereicht worden ist:
- ☐ internationale Recherche (nach Regeln 12.3 und 23.1 b))
 - ☐ Veröffentlichung der internationalen Anmeldung (nach Regel 12.4)
 - ☐ internationale vorläufige Prüfung (nach Regeln 55.2 und/oder 55.3)
2. Hinsichtlich der **Bestandteile*** der internationalen Anmeldung beruht der Bericht auf *(Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt):*

Beschreibung, Seiten

1-93 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-53 eingegangen am 18.03.2005 mit Schreiben vom 16.03.2005

Zeichnungen, Blätter

1/24-24/24 in der ursprünglich eingereichten Fassung

- ☐ einem Sequenzprotokoll und/oder etwaigen dazugehörigen Tabellen - siehe Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll
3. ☐ Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:
- ☐ Beschreibung: Seite
 - ☐ Ansprüche: Nr.
 - ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
 - ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
 - ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):
4. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der diesem Bericht beigelegten und nachstehend aufgelisteten Änderungen erstellt worden, da diese aus den im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).
- ☐ Beschreibung: Seite
 - ☐ Ansprüche: Nr.
 - ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
 - ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
 - ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

* Wenn Punkt 4 zutrifft, können einige oder alle dieser Blätter mit der Bemerkung "ersetzt" versehen werden.

Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung,

☒ Ansprüche Nr. 22- 53

Begründung:

☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie bitte nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 22-53 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

☐ Das Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll entspricht nicht dem in Anhang C zu den Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard, weil

die schriftliche Form

☐ nicht eingereicht wurde.

☐ nicht dem Standard entspricht.

die computerlesbare Form

☐ nicht eingereicht wurde.

☐ nicht dem Standard entspricht.

☐ Die Tabellen zum Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll, sofern sie nur in computerlesbarer Form vorliegen, entsprechen nicht den in Anhang C-bis zu den Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen technischen Anforderungen.

☐ siehe Beiblatt für weitere Angaben.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000099

Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. ☒ Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☒ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist.
 - ☐ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
4. Daher ist der Bericht für die folgenden Teile der internationalen Anmeldung erstellt worden:
- ☐ alle Teile.
 - ☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche mit folgenden Nummern beziehen: 1-21 .

Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35 (2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- | | |
|--------------------------------|---|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 2,8,10-11,13,15-18 |
| | Nein: Ansprüche 1, 3-7, 9, 12, 14, 19, 20, 21 |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche |
| | Nein: Ansprüche 1-21 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-21 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen (Regel 70.7):

siehe Beiblatt

Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und /oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT
ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT**

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000099

I Änderungen (Art. 34(2)b, Regel 70.2 PCT).

Die mit dem Schreiben vom 16.03.2005 eingereichten Änderungen bringen kein Sachverhalte ein die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung hinausgehen.

IV Einheitlichkeit der Erfindung (Regel 13 PCT).

Die internationale Recherchenbehörde (ISA) hat festgestellt, daß die ursprünglich eingereichten Fassung der vorliegenden Anmeldung die Erfordernisse von R. 13 PCT nicht genügen.

Die ursprünglich eingereichten unabhängigen Verfahrensansprüche 1, 22 und 35 und Produktansprüche 48, 49 und 53 der vorliegenden Patentanmeldung haben "Carotinoide" als verbindendes Merkmal gehabt.

Es ist seit längerem bekannt, daß Organismen der Gattung *Blakeslea* Carotinoide produzieren. Es ist auch seit längerem bekannt, daß die durch Organismen der Gattung *Blakeslea* produzierten Carotinoide als Nahrungsmittel oder Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden können (siehe Beschreibung, WO-98/03480 und WO-98/50574). Des weiteren sind die aus den Verfahren erhältlichen Carotinoiden, Nahrungsmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln nicht von denen die durch andere, an sich bekannte, Verfahren hergestellt werden, zu unterscheiden.

Die ursprünglich eingereichten Verfahrensansprüche und Produktansprüche wurde deshalb nicht durch ein einziges neues Merkmal verbunden und waren somit nicht im Einklang mit Regel 13 PCT.

Das ursprünglich eingereichte Sachverhalt wurde deshalb in den nachfolgenden drei Gruppen unterteilt:

- A) Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung *Blakeslea* (Ansprüche 1-21),
- B) Verfahren zur Bereitstellung von Carotinoiden, Nahrungsmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln (Ansprüche 22-47 und 50-52 (Teil)), und

- C) Carotinoide, Nahrungsmittel und Nahrungsergänzungsmittel erhältlich nach dem Verfahren der Erfindung A (Ansprüche 48, 49, 53 und 50-52 (Teil)).

Der Anmelder wurde zur Zahlung von weiteren Recherchegebühren aufgefordert. Der Anmelder hat sich dafür entschieden weder weitere Recherchegebühren zu zahlen, noch Einspruch ein zu legen. Somit wurde das internationale Recherchenbericht auf Erfindung A beschränkt (ursprünglich eingereichten Ansprüche 1-21).

Mit dem Schreiben vom 16.03.2005 hat der Anmelder das Sachverhalt der Gruppe B auf das Verfahren von Gruppe A eingeschränkt. Die vorliegenden unabhängigen Verfahrensansprüche 1, 22 und 35 haben deshalb das Verfahren des Anspruchs 1 als verbindendes Merkmal.

Die vorliegenden und ursprünglich eingereichten Ansprüche 1-21 veröffentlichen Merkmalen die sich auf die gentechnisch veränderten Organismen der Gattung *Blakeslea* beziehen. Die vorliegenden und ursprünglich eingereichten Ansprüche 22-47, im Gegenteil, veröffentlichen Merkmale die sich auf die Aufreinigung der produzierten Carotinoide beziehen.

Weil der Prüfer der Meinung ist das Anspruch 1 nicht neu und erfinderisch gegenüber D1 ist, sind die unabhängigen Verfahrensansprüche 1, 22 und 35 nicht durch ein neues und erfinderisches Merkmal verbunden.

Der Einwand zur fehlenden Einheitlichkeit wird deshalb aufrecht erhalten.

III Keine vorläufige Prüfung.

Weil der Prüfer der Meinung ist, daß:

- 1) das verbindende Merkmal zwischen den Verfahrensansprüchen 1, 22 und 35 nicht neu und erfinderisch ist (siehe unten), und
- 2) das internationale Recherchenbericht sich nur auf die in den ursprünglich eingereichten Ansprüchen 1-21 erwähnten Merkmale bezogen hat, also Merkmale der gentechnisch veränderten Organismen nicht aber Merkmale der Aufreinigung von Carotinoiden,

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
BERICHT ZUR PATENTIERBARKEIT
(BEIBLATT)**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/000099

kann für den Gegenstand der vorliegenden Ansprüche 22-47 kein internationales vorläufiges Prüfungsbescheid (IPER) erstellt werden (R. 66(1)e PCT).

V Begründete Feststellung hinsichtlich Neuheit, erfinderischen Tätigkeit und gewerblichen Anwendbarkeit der vorliegenden Anmeldung.

Gegenstand der derzeitigen Anmeldung.

Ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden, umfassend (a) die Bereitstellung von durch Transformation hergestellten genetisch geänderten Organismen der Gattung *Blakeslea*, (b) Kultivierung der Zellen, und (c) Bereitstellung des produzierten Carotinoids.

Die Bereitstellung von durch Transformation hergestellten genetisch geänderten Organismen der Gattung *Blakeslea* ist Gegenstand der Anmeldung EP04/00100.

Zitierte Dokumente (Regel 64(1) PCT).

- D1: WO 98/46772 A.
- D2: US-B1-6 413 736.
- D3: US 2002/051998 A1.
- D4: LEE ET AL. (2002) APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 60, 1-11.
- D5: WO 98/03480 A.
- D6: WO 98/50574 A.

Neuheit (Art. 33(2) PCT).

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1, 3-7, 9, 12, 14, 19, 20 und 21 im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu ist.

Das Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart die Herstellung von genetisch transformierten filamentösen Pilzen, sowie Pilze der Gattung *Blakeslea* (s. 16, z. 6). Es wird beabsichtigt um die hergestellten Pilze für die Herstellung von sekundären Metaboliten, sowie Carotinoide, zu verwenden (s. 27, z. 9). Des weiteren wird beabsichtigt um eine genetische Veränderung des Genoms vor zu nehmen, zum Beispiel durch homologe Rekombination. D1 offenbart auf s. 19, z. 5-29, daß wenn die genetisch veränderte Pilze zur Herstellung von sekundären Metaboliten bestimmt sind, daß Expressionscassette mit den erforderlichen Genen in das Genom eingeführt werden können. Die Selektion und Anzucht der gentechnisch veränderten Zellen werden zum Beispiel in Anspruch 21 und 22 offenbart. Ein Verfahren zur Herstellung von Metaboliten

wird in Anspruch 28 offenbart.

D1 wird als neuheitsschädlich gesehen weil der Prüfer der Meinung ist, daß die Kenntnisse aus D1 dem ungenauen und breiten Wortlaut der vorliegenden Ansprüche entsprechen.

Erfinderischen Tätigkeit (Art. 33(3) PCT).

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-38 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von Artikel 33(3) beruht.

Der Gegenstand des Anspruchs 2 unterscheidet sich von dem bekannten D1 dadurch, daß das Verfahren auf Pilze der Art *Blakeslea trispora* begrenzt ist.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein Verfahren bereitzustellen zur Herstellung von gentechnisch verändertem *Blakeslea trispora*.

In Betracht genommen, daß

- Anspruch 1 keine besonderen Merkmale bezüglich der Transformation enthält,
- D1 die Herstellung von gentechnisch veränderten Pilzen der Gattung *Blakeslea* offenbart,
- Organismen der Art *Blakeslea trispora* für ihre Produktion von β -Carotin bekannt sind, und
- genetische Mutationen zur Steigerung der Carotinoideproduktion der Art *Blakeslea trispora* bekannt sind,

kann die erfinderische Tätigkeit des Anspruchs 2 nicht anerkannt werden.

Die Verwendung von einem ein *gpdA* Promotor, *hph* Resistenzgen und/oder *trpC* Terminator enthaltenden Plasmid zur Transformation ist ebenfalls nicht erfinderisch, weil dies der Fachmann bekannt ist (siehe auch das internationale vorläufige Prüfungsbescheid der PCT Anmeldung EP04/00100).

Wie schon in der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung erwähnt wurde, ist eine Homokaryotisierung nur dann notwendig wenn eine genomische Gendeletion

vorgenommen werden soll. Nicht aber wenn Genen zugefügt werden sollen, sowie in D1 beabsichtigt wurde. Als alternative zur Homokaryotisierung wäre es aber auch möglich um eine RNA-Silencing vor zu nehmen.

D2, D3 und D4 offenbaren die gentechnische Herstellung von Carotinoiden und Xanthophyllen, und transformierte Organismen die die dafür erforderlichen Gene enthalten. Die Verwendung dieser Kenntnisse zur gentechnischen Herstellung von Organismen der Gattung *Blakeslea* ist naheliegend, weil es bekannt ist das diese Organismen große mengen an β -Carotin produzieren.

Der Vektor mit der SEQ ID NO: 3 ist abgeleitet von dem bekannten Vektor pANsCOS1 die zur Transformation von Pilzen bereitgestellt wurde (Osiewacz (1994) Curr. Genet. 26, 87-90). Die Verwendung vom Vektor mit der SEQ ID NO: 3 und die davon abgeleitete Vektoren in einem Verfahren zur Transformation von *Blakeslea* ist deshalb nicht erfinderisch.

Gewerblichen Anwendbarkeit (Art. 33(4) PCT).

Die gewerbliche Anwendbarkeit der Ansprüche 1-22 und 50-52 (Teil) wird anerkannt.

DREX

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung *Blakeslea* umfassend
 - 5 (i) Transformation mindestens einer der Zellen,
 - (ii) ggf.—Homokaryotisierung der aus (i) erhaltenen Zellen, so dass Zellen entstehen, in denen die Kerne in einem oder in mehreren genetischen Merkmalen alle gleichartig verändert sind und diese genetische Veränderung zur Ausprägung bringen, und
 - 10 (iii) Selektion und Vermehrung der gentechnisch veränderten Zelle oder Zellen,
 - (iv) Kultivierung der gentechnisch veränderten Zellen,
 - (v) Bereitstellung des von den gentechnisch veränderten Zellen produzierten Carotinoids oder der von den gentechnischen veränderten Zellen produzierten Carotinoidvorstufe.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Zellen von Pilzen der Art *Blakeslea trispora* handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in der Transformation (i) ein Vector oder freie Nukleinsäuren verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der in der
20 Transformation (i) eingesetzte Vector in das Genom mindestens einer der Zellen integriert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector einen Promotor und/oder einen Terminator enthält.
- 25 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass in der Transformation (i) ein Vector enthaltend den *gpd*,

pcarB, pcarRA und/oder ptef1 Promotor und/oder den trpC Terminator eingesetzt wird.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass in der Transformation (i) ein Vector enthaltend ein Resistenzgen eingesetzt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector ein Hygromycin-Resistenzgen (hph), insbesondere aus E. coli enthält.
- 10 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 5 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass der gpd Promotor die Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 5 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass der trpC Terminator die Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 5 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass der tef1 Promotor die Sequenz SEQ ID NO: 35 aufweist.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der gpd Promotor und der trpC Terminator aus Aspergillus nidulans stammen.
13. Verfahren nach einem Ansprüche 3 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Vector die SEQ ID NO: 3 umfasst.
- 20 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Transformation (i) mittels Agrobakterien, Konjugation, Chemikalien, Elektroporation, Beschuss mit DNA-beladenen Partikeln, Protoplasten oder Mikroinjektion durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in der Homokaryontisierung (ii) ein mutagenes Agens eingesetzt wird.
- 25 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass als mutagenes Agens N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidin (MNNG), UV-Strahlung oder Röntgenstrahlung eingesetzt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Selektion durch Markierung und/oder Auswahl der einkernigen Zellen erfolgt.
- 5 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 - 17, dadurch gekennzeichnet, dass in der Selektion 5-Carbon-5-deazariboflavin (darf) und Hygromycin (hyg) oder 5-Fluororotat (FOA) und Uracil und Hygromycin eingesetzt werden.
- 10 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector genetische Informationen zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen enthält.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector genetische Informationen zur Herstellung von Carotinen oder Xanthophyllen enthält.
- 15 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector genetische Informationen zur Herstellung von Astaxanthin, Zeaxanthin, Echinenon, β -Cryptoxanthin, Andonixanthin, Adonirubin, Canthaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Lycopin, β -Carotin, α -Carotin, Lutein, Phytoflu, Bixin oder Phytoen enthält.
- 20 22. Verfahren zur Bereitstellung mindestens eines hochreinen Carotinoids und eines Nahrungsmittels, enthaltend Carotinoide-produzierende Organismen und mindestens das eine Carotinoid, umfassend nach der Kultivierung von Carotinoide-produzierenden gentechnisch veränderter Organismen der Gattung *Blakeslea* gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21 die Schritte
- 25 I) Abtrennung der Biomasse,
IA) ggf. Waschen der Biomasse mit einem Carotinoide nicht lösenden Lösungsmittel, insbesondere Wasser,
IB) Sterilisation und Zellaufschluß der Biomasse,
IC) ggf. Trocknung und/oder homogene Verteilung und

- II) partielle Extraktion der Carotinoide aus der aufgeschlossenen Biomasse mittels eines Carotinoide lösenden Lösungsmittels und Trennung des Lösungsmittels von der Biomasse,

IIA)

- 1) Entfernung von Lösemittelresten aus der Carotinoid-haltigen Biomasse,
- 2) ggf. homogene Suspension der Biomasse mit einem Biomasse-Feststoffgehalt > 2 % und < 50 % ~~> 10~~
- 3) Trocknung der Biomasse bzw. Suspension zur Herstellung des Nahrungsmittels,

IIB)

- 1) Kristallisation der Carotinoide aus dem verwendeten Lösungsmittel und Isolierung der Carotinoid-Kristalle, insbesondere durch Filtration.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Carotinoid aus der Gruppe bestehend aus Carotinen und Xanthophyllen ausgewählt ist.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Carotinoid aus der Gruppe bestehend aus Astaxanthin, Zeaxanthin, Echinenon, β -Cryptoxanthin, Andonixanthin, Adonirubin, Canthaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Lycopin, β -Carotin, Lutein, Phytofluen, Bixin und Phytoen ausgewählt ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Carotinoid Astaxanthin, Zeaxanthin, Bixin oder Phytoen ist.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-25, dadurch gekennzeichnet, dass die Sterilisation und der Zellaufschluß mittels Wasserdampf oder Mikrowellenstrahlung durchgeführt werden.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-26, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion der Carotinoide aus der Biomasse mittels Methylenchlorid oder überkritischem Kohlendioxid oder Tetrahydrofuran durchgeführt wird.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die im überkritischen Kohlendioxid gelösten Carotinoide direkt isoliert werden oder in Methylenchlorid aufgenommen werden.
- 5 29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-28, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion der Carotinoide aus der Biomasse ein oder ggf. mehrstufig erfolgt.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-29, dadurch gekennzeichnet, dass die Entfernung von Lösungsmitteln aus der Biomasse im Schritt IA1) mittels Wasserdampf-Destillation .
- 10 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-30, dadurch gekennzeichnet, dass die Trocknung in Schritt IIA3) mittels Sprühtrocknung oder Kontakt Trocknung durchgeführt wird.
32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kristallisation im Schritt IIB1) durch graduellen Lösungsmittelaustausch gegen ein Carotinoide nicht lösendes Lösungsmittel erfolgt.
- 15 33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch des verwendeten Lösungsmittels gegen Wasser oder einen niederen Alkohol, insbesondere Methanol erfolgt.
34. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der gentechnisch veränderte Organismus der Gattung Blakeslea durch Transformation mit einem
- 20 Vector, der eine Sequenz aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NO: 37 – 51 und 62 aufweist, herstellbar ist.
35. Verfahren zur Herstellung eines Nahrungsmittels enthaltend Organismen der Gattung Blakeslea und mindestens ein Carotinoid, umfassend nach der Kultivierung von Carotinoide-produzierenden gentechnisch veränderter Organismen der Gattung Blakeslea gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21
- 25 Organismen der Gattung Blakeslea die Schritte
- I) Homogene Suspendierung der Feststoffe der Kulturbrühe und

- 5 IIA) bei einem Biomasse-Feststoffgehalt der Kulturbrühe von > 2 %
- 1) ggf. Konzentration der Kulturbrühe auf einen Feststoffgehalt < 50 % und
 - 2) Trocknung der Kulturbrühe zur Herstellung des Nahrungsmittels oder
- 10 IIB) bei einem Feststoffgehalt von < 2 % der Kulturbrühe,
- 1) Konzentration der Kulturbrühe auf einen Feststoffgehalt > 2 % und < 50 % und
 - 2) Trocknung der Suspension zur Herstellung des Nahrungsmittels, oder
- 15 IIC) unabhängig vom Feststoffgehalt der Kulturbrühe,
- 1) Abtrennung der Biomasse,
 - 2) ggf. Waschen der Biomasse mit Carotinoide nicht lösenden Lösungsmitteln, insbesondere Wasser,
 - 3) Sterilisation und Zellaufschluß,
 - 4) ggf. Trocknung und homogene Verteilung,
 - 5) partielle Extraktion der Carotinoide aus der Biomasse mittels eines Carotinoide lösendes Lösungsmittels,
- 20
- 5a) Abtrennung der Carotinoid-haltigen Biomasse vom Carotinoid-haltigen Lösungsmittel,
 - 5b) Entfernung von Lösemittelresten aus der Biomasse und
 - 5c) Trocknung der Biomasse zur Herstellung des Nahrungsmittels,
- 25
- 6) Kristallisation der Carotinoide aus dem in 5a) verwendeten Lösungsmittel und Isolierung der Carotinoid-Kristalle, insbesondere durch Filtration.
- 30 36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Carotinoid aus der Gruppe bestehend aus Carotinen und Xanthophyllen ausgewählt ist.
37. Verfahren nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Carotinoid aus der Gruppe bestehend aus Astaxanthin,

Zeaxanthin, Echinenon, β -Cryptoxanthin, Andonixanthin, Adonirubin, Canthaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Lycopin, β -Carotin, Lutein, Bixin, Phytoen ausgewählt ist.

- 5 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-37, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Carotinoid Astaxanthin, Zeaxanthin, *Bixin* oder Phytoen ist.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-38, dadurch gekennzeichnet, dass die Sterilisation und der Zellaufschluß im Schritt II3) mittels Wasserdampf oder Mikrowellenstrahlung durchgeführt wird.
- 10 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-39, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion der Carotinoide aus der Biomasse im Schritt IIC5) mittels Methylenchlorid oder überkritischen Kohlendioxid durchgeführt wird.
41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die im überkritischen Kohlendioxid gelösten Carotinoide direkt isoliert werden oder in Methylenchlorid aufgenommen werden..
- 15 42. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-41, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion der Carotinoide aus der Biomasse ein- oder ggf. mehrstufig erfolgt.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-42, dadurch gekennzeichnet, dass die Entfernung von Lösungsmitteln aus der Biomasse im Schritt IIC5b) mittels Wasserdampf-Destillation.
- 20 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-43, dadurch gekennzeichnet, dass die Trocknung in einem der Schritte IIA1), IIB2) oder IIC5c) mittels Sprühtrocknung oder Kontakt durchgeführt wird.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-44, dadurch gekennzeichnet, dass die Kristallisation im Schritt IIC6) durch graduellen Lösungsmittelaustausch gegen ein Carotinoide nicht lösendes Lösungsmittel erfolgt.
- 25 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch des verwendeten Lösungsmittels gegen Wasser oder einen niederen Alkohol, insbesondere Methanol erfolgt.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 35-46, dadurch gekennzeichnet, dass der gentechnisch veränderte Organismus der Gattung *Blakeslea* durch Transformation mit einem Vector, der eine Sequenz aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NO: 37 – 51 und 62 aufweist, herstellbar ist.
- 5 48. Nahrungsmittel, insbesondere Tierfuttermittel herstellbar nach einem der Verfahren der Ansprüche 1 bis 47.
49. Nahrungsergänzungsmittel, insbesondere Tierfutterergänzungsmittel herstellbar nach einem der Verfahren der Ansprüche 1 bis 47.
- 10 50. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-49 dadurch gekennzeichnet, daß Nahrungsmittel und Tierfuttermittel aus einer Fermentation erhältlich sind.
51. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-49 dadurch gekennzeichnet, daß Nahrungsergänzungsmittel und Tierfutterergänzungsmittel aus einer Fermentation erhältlich sind.
- 15 52. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-49 dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Produkte aus der Gruppe Nahrungsmittel, Nahrungsergänzungsmittel, Tierfuttermittel und Tierfutterergänzungsmittel aus einer Fermentation erhältlich sind.
- 20 53. Verwendung der nach einem der Verfahren der Ansprüche 1 bis 14 erhältlichen Carotinoide zur Herstellung von kosmetischen, pharmazeutischen, dermatologischen Zubereitungen, Nahrungsmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Tierfuttermittel oder Tierfutterergänzungsmittel.